



⑯ ⑫ Offenlegungsschrift  
⑯ ⑯ DE 196 03 649 A 1

⑯ Int. Cl. 6:  
**C 07 K 14/245**  
A 61 K 38/16  
C 12 N 15/70  
C 12 N 15/31  
C 12 N 1/21  
C 12 N 15/75  
// (C12N 1/21, C12R  
1:19)

⑯ ⑯ Aktenzeichen: 196 03 649.6  
⑯ ⑯ Anmeldetag: 1. 2. 96  
⑯ ⑯ Offenlegungstag: 7. 8. 97

⑯ ⑯ Anmelder:  
Lubitz, Werner, Prof. Dr., Wien, AT; Sleytr, Uwe,  
Prof. Dr., Wien, AT

⑯ ⑯ Vertreter:  
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

⑯ ⑯ Erfinder:  
Lubitz, Werner, Prof. Dr., Wien, AT; Sleytr, Uwe,  
Prof. Dr., Wien, AT; Kuen, Baetrix, Dr., Wien, AT

⑯ ⑯ Rekombinante Expression von S-Layer-Proteinen

⑯ ⑯ Die Erfindung betrifft Verfahren zur rekombinanten Her-  
stellung von S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszel-  
len. Weiterhin werden die Nukleotidsequenz eines neuen  
S-Layer-Gens und Verfahren zur Herstellung modifizierter  
S-Layer-Proteine offenbart.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen und modifizierten S-Layer-Proteinen in gram-negativen Wirtszellen.

5 Kristalline bakterielle Zelloberflächenlayer (S-Layer) bilden in vielen Eubakterien und den allermeisten Archaeabakterien die äußerste Zellwandkomponente (Sleytr et al. (1988), Crystalline Bacterial Cell Surface Layers, Springer Verlag Berlin; Messner und Sleytr, Adv. Mikrob. Physiol. 33 (1992), 213–275). Die meisten der gegenwärtig bekannten S-Layer-Proteine sind aus identischen Proteinen bzw. Glykoproteinen zusammengesetzt, die scheinbare Molekulargewichte im Bereich von 40 000 bis 220 000 aufweisen. Die Komponenten von 10 S-Layern sind selbst-assemblierend und die meisten Gitter haben eine schräge (p2), quadratische (p4) oder hexagonale (p6) Symmetrie. Die Funktionen von bakteriellen S-Layern sind immer noch nicht vollständig bekannt, aber aufgrund ihrer Lokalisierung an der Zelloberfläche dürften die porösen kristallinen S-Layer hauptsächlich als Schutzhüllen, Molekularsiebe oder zur Förderung der Zelladhäsion und Oberflächenerkennung dienen.

15 Genetische Daten und Sequenzinformationen sind für verschiedene S-Layer-Gene aus Mikroorganismen bekannt. Eine Übersicht findet sich bei Peyret et al., Mol. Mikrobiol. 9 (1993), 97–109. Auf diese Daten wird ausdrücklich Bezug genommen. Die Sequenz des für das S-Layer-Protein von *B.stearothermophilus* PV72 kodierenden Gens *sbsA* und ein Verfahren zu dessen Klonierung sind bei Kuen et al. (Gene 145 (1994), 115–120) angegeben.

20 *B.stearothermophilus* PV72 ist ein gram-positives Bakterium, das mit einem hexagonal angeordneten S-Layer bedeckt ist. Die Hauptkomponente des S-Layer ist ein 128 kd-Protein, bei dem es sich um das häufigste Protein in der Zelle mit einem Anteil von ungefähr 15% bezüglich der gesamten Proteinbestandteile handelt. Es sind verschiedene Stämme von *B.stearothermophilus* charakterisiert worden, die hinsichtlich des Typs von S-Layer-Gitter, dem Molekulargewicht und der Glykosilierung der S-Layer-Komponenten unterschiedlich sind (Messner und Sleytr (1992), *supra*).

25 Die deutsche Patentanmeldung P 44 25 527.6 offenbart den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt des S-Layer-Gens aus *B.stearothermophilus* und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz. Die Spalt stelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure kann operativ mit einer Protein-kodierenden Nukleinsäure verknüpft werden und zur rekombinanten Herstellung von Proteinen in einem Verfahren verwendet werden, bei dem man 30 eine transformierte Wirtszelle bereitstellt, die Wirtszelle unter Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung und Sekretion des davon kodierten Polypeptids führen, und das resultierende Polypeptid aus dem Kulturmedium gewinnt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise prokaryontische Organismen, insbesondere gram-positive Organismen der Gattung *Bacillus* genannt.

35 Überraschenderweise wurde festgestellt, daß die rekombinante Herstellung von S-Layer-Proteinen nicht nur in gram-positiven prokaryontischen Wirtszellen, sondern auch in gram-negativen prokaryontischen Wirtszellen möglich ist. Dabei bildet sich das S-Layer-Protein im Inneren der Wirtszelle nicht in Form von ungeordneten Einschlußkörpern, sondern unerwarteterweise in Form von geordneten monomolekularen Schichten.

40 Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung von S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man (a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure, ausgewählt aus (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und (iii) einer 45 Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt; (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle gewinnt.

50 Unter dem Begriff "stringente Hybridisierung" im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man, daß eine Hybridisierung auch nach waschen bei 55°C, vorzugsweise 60°C, in einem wäßrigen Niedrigsalz-Puffer (z. B. 0,2 xSSC) noch auftritt (s. auch Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A. Laboratory Manual).

55 Das erfindungsgemäße Verfahren wird in gram-negativen prokaryontischen Wirtszellen durchgeführt. Dabei wird überraschenderweise im Zellinneren eine geordnete S-Layer-Proteinstruktur erhalten. Vorzugsweise werden als Wirtszellen Enterobakterien, insbesondere *E. coli*, verwendet. Besonders bevorzugt ist der *E. coli*-Stamm *pop2125*, der am 31.01.1996 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder weg 1b, D 38124 Braunschweig unter dem Aktenzeichen DSM 10509 hinterlegt wurde.

60 Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Gewinnung rekombinanter S-Layer-Proteine eingesetzt werden. Hierzu verwendet man eine für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure, die eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid- oder Polypeptidsequenzen kodieren. Diese Insertionen können einerseits nur für Peptide mit wenigen Aminosäuren, z. B. 1–25 Aminosäuren, kodieren. Andererseits können die Insertionen auch für größere Polypeptide von z. B. bis zu 1000 Aminosäuren und vorzugsweise bis zu 500 Aminosäuren kodieren, ohne daß die Fähigkeit des S-Layer-Proteins zur Ausbildung einer korrekt gefalteten Struktur verlorengeht. Neben den Insertionen kann das rekombinante S-Layer-Protein auch Aminosäuresubstitutionen, insbesondere Substitutionen einzelner Aminosäuren im Bereich der Insertionsorte sowie gegebenenfalls Deletionen 65 einzelner Aminosäuren oder kurzer Aminosäureabschnitte von bis zu 30 Aminosäuren aufweisen.

65 Als insertionsstellen für Polypeptid-kodierende Sequenzen bevorzugt sind Bereiche zwischen den Positionen 1–1200 und 2200–3000 der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz. Besonders bevorzugte insertionsstellen sind die *Nru*I-Schnittstelle an Position 582, die *Pvu*II-Schnittstelle an Position 878, die *Sna*B-I-Schnittstel-

le an Position 917, die Pvull-Schnittstelle an Position 2504 und die Pvull-Schnittstelle an Position 2649. Die Insertion einer für Streptavidin kodierenden Nukleinsäuresequenz konnte bereits in die NruI-Schnittstelle an Position 581 gezeigt werden.

Die Peptid- oder Polypeptid-kodierenden Insertionen werden vorzugsweise ausgewählt aus Nukleotidsequenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren geladenen Aminosäuren, z. B. Arg, Lys, Asp oder Glu, oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epitope, antigene, allergene oder immunogene Epitope, metallbindende Epitope, Streptavidin, Enzyme, Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.

Ein besonders bevorzugtes Beispiel für eine Insertion in die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ist eine für Streptavidin kodierende Nukleotidsequenz. Auf diese Weise können universelle Trägermoleküle erhalten werden, die zur Ankopplung von biotinylierten Reagenzien und zum Nachweis in immunologischen oder Hybridisierungstestverfahren geeignet sind.

Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für Insertionen sind antigene, allergene oder immunogene Epitope, z. B. Epitope aus pathogenen Mikroorganismen, wie etwa Bakterien, Pilzen, Parasiten etc. und Viren, oder Epitope aus Pflanzen oder Epitope gegen körpereigene Substanzen, z. B. Cytokine, sowie gegen Toxine, insbesondere Endotoxine. Besonders bevorzugte Beispiele für immunogene Epitope sind Epitope aus Herpesviren, wie etwa Herpesvirus 6 oder Pseudorabiesvirus (Lomniczi et al., J. Virol. 49 (1984), 970–979), insbesondere Epitope aus den Genen gB, gC oder/und gD, oder Maul- und Klauenseucheivirus (FMDV), insbesondere Epitope aus den Genabschnitten, die für VP1, VP2 oder/und VP3 kodieren. Die immunogenen Epitope können so ausgewählt werden, daß sie die Erzeugung einer Antikörpervermittelten Immunreaktion fördern oder/und die Erzeugung einer zellulären Immunreaktion, z. B. durch Stimulation von T-Zellen, fördern. Beispiele für geeignete allergene Epitope sind Birkenpollenallergene, z. B. Bet v 1 (Ebner et al., J. Immunol. 150 (1993) 1047–1054). Weiterhin besonders bevorzugt sind antigene Epitope, die in der Lage sind, aus Serum oder anderen Körperflüssigkeiten körpereigene oder körperfremde Substanzen wie etwa Cytokine oder Toxine zu binden und herauszufiltern. Derartige Epitope können Bestandteile von Cytokin- oder Toxinrezeptoren oder von Antikörpern gegen Cytokine oder Toxine umfassen.

Andererseits können die Insertionen auch für Enzyme kodieren. Bevorzugte Beispiele sind Enzyme zur Synthese von Polyhydroxybuttersäure, z. B. PHB-Synthase. Durch Einbau von PHB-Synthase in den S-Layer kann bei Zufuhr des Substrats Hydroxybuttersäure unter geeigneten Bedingungen eine molekulare Spindüse entstehen. Ein weiteres bevorzugtes Beispiel für ein Enzym ist bakterielle Luciferase. Hier kann bei Zufuhr des Enzymsubstrates, eines Aldehyds, und in Anwesenheit von O<sub>2</sub> ein molekularer Laser erhalten werden.

Ebenfalls bevorzugt sind Insertionen, die für Cytokine, wie etwa Interleukine, Interferone oder Tumornekrosefaktoren kodieren. Diese Moleküle können beispielsweise in Kombination mit immunogenen Epitopen zur Herstellung von Vakzinen verwendet werden.

Schließlich sind auch Insertionen bevorzugt, die für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa Protein-A oder Protein-G oder für DNA- oder/und metallbindende Epitope, wie etwa Leucin-Zipper, Zinkfinger etc. kodieren.

Vorzugsweise wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure in operativer Verknüpfung mit einer für ein Signalpeptid von gram-positiven Bakterien kodierenden Nukleinsäure verwendet, d. h. 5'-seitig von der S-Layer-Protein-kodierenden Nukleinsäure ist die Signalpeptid-kodierende Nukleinsäure angeordnet. Überraschenderweise wurde nämlich festgestellt, daß die Anwesenheit derartiger Signalpeptidsequenzen, die in den erfindungsgemäß verwendeten gram-negativen Wirtszellen nicht abgespalten werden, die Stabilität der S-Layer-Strukturen verbessern kann. Besonders bevorzugt umfaßt die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure (a) den signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nukleotidsequenz, (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/und (c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% homologe Nukleotidsequenz.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

In SEQ ID NO. 1 ist die kodierende Nukleotidsequenz des S-Layer-Gens sbsA aus *B.stearothermophilus* einschließlich des Signalpeptid-kodierenden Abschnitts gezeigt. Der Signalpeptidkodierende Abschnitt reicht von Position 1–90 der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz. Der für das reife SbsA-Polypeptid kodierende Abschnitt reicht von Position 91–3684.

Das sbsA-Gen von *B.stearothermophilus* kodiert für ein Protein mit insgesamt 1228 Aminosäuren einschließlich eines N-terminalen Signalpeptids mit 30 Aminosäuren (SEQ ID NO. 2). Die Spaltstelle zwischen dem Signalpeptid und dem reifen Protein befindet sich zwischen Position 30 und 31 der Aminosäuresequenz. Das Signalpeptid weist eine basische aminotermrale Domäne, gefolgt von einer hydrophoben Domäne, auf.

Sequenzvergleiche mit anderen Signalpeptiden zeigen eine gewisse Homologie zu Signalpeptiden von extrazellulären Proteinen in Bazillen, wie etwa alkalische Phosphatase und neutrale Phosphatase von *B.amyloliquefaciens* (Vasantha et al., J. Bacteriol. 159 (1984), 811–819) sowie mit den Signalpeptiden für das *B.sphaericus*-Gen 125 (Bowditch et al., J. Bact. 171 (1989), 4178–4188) und das OWP-Gen von *B. brevis* (Tsuboi et al., J. Bacteriol. 168 (1986), 365–373).

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein rekombinanter Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure enthält. Der Vektor ist vorzugsweise in Prokaryonten replizierbar. Besonders bevorzugt ist der Vektor ein prokaryontisches Plasmid.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einer Nukleinsäure oder

inem rekombinanten Vektor gemäß vorliegender Erfahrung transformiert ist. Vorzugsweise ist die Zelle ein gram-negativer prokaryontischer Organismus und am meisten bevorzugt eine *E. coli*-Zelle. Verfahren zur Transformation von Zellen mit Nukleinsäuren sind allgemeiner Stand der Technik (siehe Sambrook et al, *supra*) und brauchen daher nicht erläutert zu werden.

5 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfahrung ist ein rekombinantes S-Layer-Protein, das innerhalb der in SEQ ID NO. 2 gezeigten Aminosäuresequenz mindestens eine Peptidoder/und Polypeptidinsertion enthält. Bevorzugte Beispiele für Peptid- und Polypeptidinsertionen wurden bereits erläutert.

Aus erfundungsgemäßen rekombinanten S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur assembliert werden, die als Untereinheit mindestens ein erfundungsgemäßes rekombinantes S-Layer-Protein 10 enthält. Weiterhin ist bevorzugt, daß die erfundungsgemäße S-Layer-Struktur als "Verdünnungsmoleküle" auch nichtmodifizierte S-Layer-Proteine enthält. Die nichtmodifizierten S-Layer-Proteine liegen vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10–99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor.

15 Die erfundungsgemäße S-Layer-Struktur kann mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung miteinander verknüpfte Schichten umfassen. Kovalente Verknüpfungen können beispielsweise durch Insertionen von Cysteinresten und einer anschließenden Ausbildung von Cystinbrücken eingeführt werden. Verknüpfungen durch Affinitätsbindung umfassen beispielsweise Antikörper-Antigen-, Antikörper-Protein A- bzw. -Protein G- oder 20 Streptavidin-Biotin-Wechselwirkungen.

25 S-Layer-Strukturen, die rekombinante S-Layer-Proteine enthalten, können gegebenenfalls auch in trägergebundener Form hergestellt werden. Hierzu kann die Reassemblierung der S-Layer-Struktur aus einzelnen Einheiten in Gegenwart eines Peptidoglycanträgers erfolgen, wobei beispielsweise Peptidoglycanschichten 20 erzeugt werden, die auf einer oder auf beiden Seiten mit einer S-Layer-Struktur überzogen sind. Eine andere Möglichkeit zur Herstellung trägergebundener S-Layer-Strukturen besteht darin, eine S-Layer-Schicht an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien, z. B. wasser/Luft, zu erzeugen und diese Schicht auf einer Festphase, z. B. einer Filtermembran, zu immobilisieren (vgl. z. B. Pum und Sleytr (1994), *Thin Solid Films* 244, 882–886; Küpcü et al. (1995), *Biochim. Biophys. Acta* 1235, 263–269).

30 Die erfundungsgemäßen rekombinanten S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen sind für eine Vielzahl von Anwendungen geeignet. Besonders bevorzugt ist die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans, wobei man rekombinante S-Layer-Proteine verwendet, die immunogene Epitope von Pathogenen und/oder körpereigene immunstimulierende Polypeptide, wie etwa Cytokine, enthalten. Bei dieser Anwendung ist nicht unbedingt eine Reinigung der rekombinanten S-Layer-Proteine erforderlich. Statt dessen kann beispielsweise die Verwendung in Kombination mit einem Bakterienghost erfolgen, der ggf. in seiner Membran zusätzliche immunogene Epitope enthält.

35 Die Herstellung geeigneter "Bakterienghosts" ist beispielsweise in der internationalen Patentanmeldung PCT/EP91/00967 beschrieben, auf die hiermit Bezug genommen wird. Dort werden modifizierte Bakterien offenbart, erhältlich durch Transformation eines gram-negativen Bakteriums mit dem Gen eines lytisch wirkenden Membranproteins aus Bakteriophagen, mit dem Gen eines lytisch wirkenden Toxin-Freisetzungspoteins oder mit Genen, die Teilsequenzen davon, die für lytische Proteine kodieren, enthalten, Kultivierung des Bakteriums, Expression dieses Lyse-Gens und Isolierung des resultierenden Bakterienghosts aus dem Kulturmedium.

40 An die Membran dieser Bakterien kann, wie im europäischen Patent 0 516 655 beschrieben, ein rekombinantes Protein gebunden sein, das durch Expression einer rekombinanten DNA in diesen gram-negativen Bakterien erhältlich ist. Diese rekombinante DNA umfaßt eine erste DNA-Sequenz, welche für eine hydrophobe, nicht lytisch wirkende membranintegrierende Proteindomäne, die eine  $\alpha$ -helikale Struktur besitzt und aus 14–20 Aminosäuren besteht, die N- und C-terminal von je 2–30 beliebigen Aminosäuren flankiert sein können, kodiert.

45 Mit dieser ersten DNA-Sequenz in operativer Verknüpfung befindet sich eine zweite DNA-Sequenz, die für ein gewünschtes rekombinantes Protein kodiert. Weiterhin enthält das gram-negative Bakterium eine dritte DNA-Sequenz, die unter einer von den ersten und zweiten DNA-Sequenzen getrennten Kontrolle steht und für in lytisch wirkende S Membranprotein aus Bakteriophagen oder ein lytisch wirkendes Toxin-Freisetzungspotein oder für deren lytisch wirkende Teile kodiert. Durch Expression und Lyse derartiger rekombinanter, gram-negativer Bakterien werden sog. "Bakterienghosts" erhalten, die eine intakte Oberflächenstruktur mit an die Oberfläche gebundenen immunogenen Epitopen enthalten.

50 Bei Kombination dieser Bakterienghosts mit erfundungsgemäßen rekombinanten S-Layern können Vakzine und Adjuvantien erzeugt werden, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen.

55 Es wurde festgestellt, daß das gram-positive Bakterium *B. stearothermophilus* PV72 neben SbsA noch ein weiteres S-Layer-Protein enthält, das in der Folge als SbsB bezeichnet wird. (Sara und Sleytr (1994), *J. Bacteriol.* 176, 7182–7189). Durch Amplifikation unter Verwendung geeigneter Nukleinsäureprimer konnte das sbsB-Gen isoliert und charakterisiert werden. In SEQ ID NO. 5 ist die kodierende Nukleotidsequenz des S-Layer-Gens sbsB aus *B. stearothermophilus* einschließlich des Signalpeptid-kodierenden Abschnitts, der von Position 1–93 der Nukleinsäuresequenz reicht, gezeigt. In SEQ ID NO. 6 ist die davon abgeleitete Aminosäuresequenz gezeigt. 60 Das sbsB-Gen kodiert für ein Protein mit insgesamt 921 Aminosäuren einschließlich eines N-terminalen Signalpeptids mit 31 Aminosäuren.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfahrung ist somit eine Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus

65 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,  
(ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechend Nukleotidsequenz umfaßt, und

(iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

Ebenso wie beim sbsA-Gen kann auch beim sbsB-Gen innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine für ein Peptid oder Polypeptid kodierende Nukleinsäureinsertion eingefügt werden. Bezuglich bevorzugter Beispiele für Insertionen im sbsB-Gen wird auf die zuvor gemachten Ausführungen hinsichtlich des sbsA-Gens verwiesen. 5

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie eines sbsB-Gens gegebenenfalls mit Insertion enthält. Dieser Vektor kann in Eukaryonten, Prokaryonten oder in Eukaryonten und Prokaryonten replizierbar sein. Er kann in ein das Genom der Wirtszelle integrierbarer Vektor oder ein Vektor sein, der extrachromosomal vorliegt. Vorzugsweise ist der erfindungsgemäße Vektor ein Plasmid, insbesondere ein prokaryontisches Plasmid. 10

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, die mit einem sbsB-Gen transformiert ist, wobei das sbsB-Gen gegebenenfalls eine Insertion enthalten kann. Die Wirtszelle kann sowohl eine eukaryontische als auch eine prokaryontische Zelle sein. Vorzugsweise ist die Zelle ein prokaryontischer Organismus. Sowohl gram-positive Organismen, z. B. Organismen der Gattung *Bacillus*, als auch gram-negative Organismen, wie etwa Enterobakterien, insbesondere *E. coli*, sind bevorzugt. Verfahren zur Transformation von eukaryontischen und prokaryontischen Zellen mit Nukleinsäuren sind bekannt und brauchen daher nicht ausführlich erläutert werden. 15

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung ein SbsB-Protein, d. h. ein S-Layer-Protein, das von einer Nukleinsäure, wie vorstehend definiert kodiert ist. Besonders bevorzugt sind rekombinante SbsB-Proteine, die eine oder mehrere Peptidoder/und Polypeptidinsertionen innerhalb der sbsB-Sequenz enthalten. Besonders bevorzugt weist der SbsB-Anteil eines erfindungsgemäßen Polypeptids eine Homologie von mindestens 80% und insbesondere mindestens 90% zu der in SEQ ID NO. 6 gezeigten Aminosäuresequenz auf. 20

Auch aus den rekombinanten SbsB-S-Layer-Proteinmolekülen kann eine rekombinante S-Layer-Struktur entsprechend der rekombinanten SbsA-S-Layer-Struktur assembliert werden. In dieser Struktur liegen die nichtmodifizierten S-Layerproteine vorzugsweise in einem molaren Anteil von 10–99% bezüglich der gesamten S-Layer-Proteine vor. 25

Auch die Anwendungen der erfindungsgemäßen rekombinanten sbsB-S-Layer-Proteine und S-Layer-Strukturen entsprechen den vorstehend für SbsA genannten Anwendungen. Insbesondere ist dabei die Verwendung als Vakzin oder Adjuvans bemerkenswert. 30

Rekombinante S-Layer-Proteine sind erhältlich durch ein Verfahren, bei dem man

- (a) eine Wirtszelle bereitstellt, die eine für ein S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure enthält, die innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält, 35
- (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen, und
- (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle oder dem Kulturmedium gewinnt. 40

In einer ersten bevorzugten Ausführungsform dieses Verfahrens wird ein rekombinantes sbsA-S-Layer-Protein hergestellt, d. h. die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure wird ausgewählt aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID No. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, 45
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt. 50

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform wird ein rekombinantes SbsB-S-Layer-Protein hergestellt, d. h. die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure wird ausgewählt aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt, 55
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt. 60

Neben den rekombinanten SbsA und SbsB-S-Layer-Proteinen aus *B.stearothermophilus* können jedoch auch rekombinante S-Layer-Proteine aus anderen Organismen (vgl. z. B. Peyret et al. (1993), *supra*) hergestellt werden.

Die Herstellung der rekombinanten S-Layer-Proteine kann einerseits in einer heterologen Wirtszelle erfolgen, d. h. in einer Wirtszelle, die ursprünglich kein S-Layer-Gen enthält. Beispiele für solche heterologen Wirtszellen sind gram-negative prokaryontische Organismen, wie etwa *E. coli*. 65

Oft ist jedoch die Herstellung der rekombinanten S-Layer-Proteine in homologen Wirtszellen bevorzugt, d. h. in Wirtszellen, die ursprünglich ein natürliches S-Layer-Gen enthalten. In einer Ausführungsform dieser homolo-

gen Expression wird das rekombinante S-Layer-Gen in die Wirtszelle so eingeführt, daß die Wirtszelle noch in der Lage ist, ein weiteres S-Layer-Gen zu exprimieren, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert. Vorzugsweise ist das nichtmodifizierte S-Layer-Protein in der Lage, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein Beispiel für diese Ausführungsform der homologen Expression ist eine *B.stearothermophilus* PV72 Zelle, welche intakte natürliche sbsA- oder/und sbsB-Gene enthält, und die mit einem Plasmid transformiert ist, welches ein rekombinantes S-Layer-Gen enthält.

In einer zweiten Ausführungsform kann die homologe Expression in einer Wirtszelle erfolgen, in der das ursprünglich vorhandene intakte S-Layer-Gen inaktiviert wurde. Folglich wird in dieser Ausführungsform in der Wirtszelle kein weiteres S-Layer-Gen mehr exprimiert, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert, welches in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden. Ein spezifisches Beispiel für eine derartige Wirtszelle ist eine *B.stearothermophilus* PV72 Zelle, in deren Genom z. B. durch homologe Rekombination ein für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodierendes Gen eingeführt wurde, welches das ursprüngliche S-Layer-Gen ersetzt. Ein weiterer Beispiel für eine derartige Wirtszelle ist eine *B. stearothermophilus*-Zelle, in der das native S-Layer-Gen z. B. durch ortsspezifische Mutagenese oder/und homologe Rekombination inaktiviert wurde und die mit einem ein rekombinantes S-Layer-Gen enthaltenen Vektor transformiert ist.

Bei der homologen Expression rekombinanter S-Layer-Gene werden als Wirtszellen üblicherweise gram-positive prokaryontische Organismen verwendet. Besonders bevorzugt als Wirtszelle ist *B.stearothermophilus* PV72, der bei hoher Temperatur in einem definierten synthetischen Medium (Schuster et al., (1995), Biotechnol. and Bioeng. 48: 66–77) kultiviert werden kann.

Weiterhin wird die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele und Figuren erläutert. Es zeigen: SEQ ID NO. 1 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens sbsA von *B. stearothermophilus*;

SEQ ID NO. 2 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;

SEQ ID NO. 3 die Nukleotidsequenz des Primers T5-X;

SEQ ID NO. 4 die Nukleotidsequenz des Primers E;

SEQ ID NO. 5 die vollständige Nukleotidsequenz des kodierenden Abschnitts des S-Layer-Gens sbsB von *B. stearothermophilus*;

SEQ ID NO. 6 die davon abgeleitete Aminosäuresequenz;

SEQ ID NO. 7 die Nukleotidsequenz eines Teilfragments des Streptavidingens;

SEQ ID NO. 8 die Nukleotidsequenz des Primers NIS 2AG;

SEQ ID NO. 9 die Nukleotidsequenz des Primers LIS C3;

Fig. 1 eine schematische Darstellung des zur Herstellung des rekombinanten Vektors pBK4 verwendeten sbsA PCR-Fragments;

Fig. 2 eine schematische Darstellung von Peptidinsertionen in die Aminosäuresequenz des SbsA S-Layer-Proteins und

Fig. 3 eine schematische Darstellung von Aminosäuresubstitutionen und -insertionen in rekombinanten S-Layer-Proteinen.

## 40 BEISPIELE

### 1. Bakterienstämme, Medien und Plasmide

Gram-positive Bakterien des Stammes *Bacillus stearothermophilus* PV72 wurden bei 58°C in SVIII-Medium (Bartelmus und Perschak, Z. Zuckerind. 7 (1957), 276–281) kultiviert. Bakterien des Stammes *E. coli* pop2135 (endA, thi, hsdR, malT, cl857, λpR, malPQ) wurden in LB-Medium kultiviert (Sambrook et al., (1989), supra). Zur Selektion von Transformanten wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml dem Medium zugegeben. Das Plasmid pPLcAT10 (λpL, bla, colE1) (Stanssens et al., Gene 36 (1985), 211–223) wurde als Klonierungsvektor verwendet.

### 50 2. Manipulation von DNA-Fragmenten

Restriktionsanalyse von DNA, Agarosegelektrophorese und Klonierung von DNA-Fragmenten wurden nach den bei Sambrook et al. (1989), supra, beschriebenen Standardmethoden durchgeführt.

Die Transformation von kompetenten Zellen erfolgte durch Elektroporation unter Verwendung eines Bio-Rad GenePulsers (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Kalif., USA) nach Protokollen des Herstellers.

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim und Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513–1523) isoliert. Chromosomal DNA wurde gemäß der bei Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology (1987), New York, John Wiley) beschriebenen Verfahren isoliert.

Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden von Boehringer Mannheim, New England Biolabs oder Stratagene bezogen und gemäß den Vorschriften der Hersteller eingesetzt.

### 3. DNA-Sequenzierung

65 Die DNA-Sequenzen der 5'- und 3'-Regionen (einschließlich des für die Signalsequenz kodierenden Bereichs) des Gens sbsA im Vektor pPLcAT10 wurde nach der Dideoxyketteterminationsmethode von Sanger et al. bestimmt. Die zur Sequenzierung verwendeten Primer wurden auf Basis der in den publizierten sbsA-Sequenz (Kuen et al., Gene 145 (1994), 115–120) konstruiert.

## 4. PCR-Amplifikation von sbsA

Die PCR-Amplifikation des sbsA-Gens erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 100 µl, in dem 200 µM Deoxynukleotide, 1U Pfu-Polymerase (Stratagene), 1x Pfu-Reaktionspuffer, jeweils 0,5 µM Oligonukleotidprimer und 100 ng genomicscher DNA aus *B.stearothermophilus* als Matrize vorhanden waren. Die Amplifikation wurde über 30 Zyklen in einem Thermocycler (Biomed Thermocycler 60) durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt von 1,5 min bei 95°C, einem Annealingschritt von 1 min bei 56°C und 1 min bei 50°C sowie einem Extensionsschritt von 2 min bei 72°C.

Als Primer wurden der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 3 angegebene Primer T5-X, der den 5'-Bereich von sbsA flankiert und eine XbaI-Stelle enthält, sowie der im Sequenzprotokoll in SEQ ID NO. 4 gezeigte Primer E verwendet, der die 20 Nukleotide stromabwärts gelegene Region des Transkriptionsterminators der sbsA-Sequenz flankiert und eine BamHI-Stelle enthält.

Die PCR-amplifizierten Produkte wurden auf einem 0,8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und zur Klonierung unter Verwendung des Systems von Gene Clean (BIO101 La Jolla, Kalif, USA) zur Klonierung gereinigt.

## 5. Klonierung des sbsA-Gens in den Vektor pPLcAT10

Das durch PCR gewonnene sbsA-Gen mit einer Länge von 3,79 kb wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und BamHI gespalten. Das resultierende XbaI-BamHI-Fragment wurde in die entsprechenden Restriktionsstellen des Vektors pPLcAT10 kloniert, so daß das sbsA-Gen unter transkriptioneller Kontrolle des stromaufwärts gelegenen pL-Promotors war. Das ATG-Startkodon der sbsA-Sequenz wurde durch die Klonierungsprozedur rekonstruiert. Die klonierte sbsA-Sequenz enthielt die N-terminale Signalsequenz von sbsA und endete 20 nt nach dem Transkriptionsterminator. Nach Ligation der Vektor-DNA mit dem sbsA-Fragment wurde der *E. coli*-Stamm pop2135 durch Elektrotransformation transformiert. Die resultierenden Klone wurden einer DNA-Restriktionsanalyse unterzogen. Ein positiver Klon wurde sequenziert, um die korrekten Sequenzübergänge an den 5'- und 3'-Enden zu verifizieren. Dieser Klon wurde als pBK4 bezeichnet.

Eine schematische Darstellung des 3,79 kb XbaI sbsA-Fragments und seine Lokalisierung in der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pBK4 ist in Fig. 1 dargestellt (Abkürzungen: tT: Transkriptionsterminator; ori: Ursprung der DNA-Replikation; amp: Ampicillinresistenzgen).

6. Rekombinante Expression des sbsA-Gens in *E. coli*

*E. coli* pop2135/pBK4-Zellen wurden bei 28°C bis zum Erreichen einer optischen Dichte OD<sub>600</sub> von 0,3 kultiviert. Dann wurde die Expression von sbsA durch Erhöhung der Kultivierungstemperatur von 28°C auf 42°C induziert. 1,5 ml Aliquots wurden vor bzw. 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Induktion der sbsA-Expression entnommen. Als Kontrollen wurden *E. coli* pop2135/pPLcAT10 (kultiviert unter den gleichen Bedingungen) und *B.stearothermophilus* PV72 verwendet.

Kulturüberstände und Zellextrakte aus allen Proben wurden auf die Expression des S-Layer-Proteins durch SDS-PAGE und Western-Immunoblotting untersucht.

In Extrakten aus mit pBK4 transformierten *E. coli*-Zellen wurde eine zusätzliche starke Proteinbande mit dem gleichen Molekulargewicht wie das Wildtyp-SbsA-Protein gefunden. Es wurden keine Abbauprodukte von SbsA selbst in einem Zeitraum bis zu 5 Stunden nach der Induktion der Expression gefunden. Dies läßt vermuten, daß das S-Layer-Protein sbsA in *E. coli* stabil ist und nicht durch Proteasen abgebaut wird.

Es wurde eine densitometrische Bestimmung der relativen Menge an SbsA-Protein durchgeführt. Zu einem Zeitpunkt von 4 Stunden nach der Induktion lag das sbsA-Protein in einem Anteil von ca. 16% bezüglich des gesamten zellulären Proteins vor.

Das in *E. coli* erzeugte SbsA-Protein wanderte im SDS-Gel etwas langsamer als das natürliche SbsA-Protein aus *B.stearothermophilus*. Versuche zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des SbsA-Proteins durch Edman-Abbau schlugen aufgrund einer Blockierung des N-Terminus fehl. Dies läßt vermuten, daß die Signalsequenz in *E. coli* nicht abgespalten wurde.

Auch eine Western Blot-Analyse von Gesamtzellextrakten und Kulturüberständen von *E. coli*/pBK4 ergab nur eine einzige sbsA-spezifische Proteinbande mit einem etwas höheren Molekulargewicht als das Wildtyp-SbsA-Protein aus *stearothermophilus*.

Für den Western Blot wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyclonalen Antiserum gegen SbsA aus Kaninchen inkubiert. Die Herstellung dieses Antiseraums ist bei Egelseer et al. (J. Bacteriol. 177 (1995), 1444–1451) beschrieben. Zum Nachweis gebundener SbsA-spezifischer Antikörper wurde ein Konjugat aus Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG und alkalischer Phosphatase verwendet.

Aus Überständen von mit pBK4 transformierten *E. coli*-Zellen konnte auch nach Induktion der sbsA-Gen-Expression kein SbsA-Protein nachgewiesen werden. Daraus ist ersichtlich, daß SbsA nicht in das umgebende Medium exportiert wird.

7. Lokalisierung und Organisation des S-Layer-Proteins SbsA im Cytoplasma von *E. coli*

Zellen aus *E. coli* pop2135/pBK4, die aus Kulturen mit 1, 2, 3 und 5 Stunden nach Induktion der S-Layer-Proteinexpression geerntet wurden, wurden auf die intrazelluläre Organisation von sbsA untersucht. Nichtinduzierte, bei 28°C kultivierte Zellen und Zellen von *B.stearothermophilus* PV72 wurden als Kontrollen untersucht.

Hierzu wurden gesamte Zellen beider Organismen fixiert und in Spurharz nach der Methode von Messner et

al. (Int. J. Syst. Bacteriol. 34 (1984), 202 – 210) fixiert und eingebettet. Anschließend wurden ultradünne Schnitte der eingebetteten Präparate hergestellt und mit Uranylacetat angefärbt.

Das Cytoplasma von nichtinduzierten *E. coli*-Zellen zeigte die typische granuläre Struktur, die sich auch bei einer Zunahme der OD der Suspensionen nicht änderte. Längsschnitte von *E. coli*-Zellen, die 1 Stunde nach Induktion der S-Layer-Proteinexpression geerntet wurden, zeigten parallele, blattartige Strukturen im Cytoplasma. Aus Querschnitten wurde ersichtlich, daß diese Strukturen eine konzentrische Anordnung zeigten.

Der Anteil blattartiger Strukturen zeigte einen deutlichen Anstieg zwischen 1 und 2 Stunden nach Induktion der *sbsA*-Expression und blieb danach im wesentlichen konstant.

Das in *E. coli* rekombinant hergestellte *sbsA*-Protein konnte auch durch Immunogoldmarkierung mit *SbsA*-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Auch mit dieser Nachweismethode wurde eine geordnete Struktur des rekombinant hergestellten *SbsA*-Proteins gefunden.

Aus diesen morphologischen Daten war klar ersichtlich, daß das *SbsA*-Protein sich nicht zu unregelmäßigen Einschlußkörpern aggregierte, sondern monomolekulare S-Layer-Kristalle bildete. Eine bemerkenswerte Eigenschaft der in *E. coli* assemblierten *SbsA*-S-Layer-Schichten war die konzentrische Anordnung in definierten Abständen. Das Vorhandensein der Signalsequenz störte die korrekte Assemblierung nicht.

#### 8. Herstellung von rekombinanten *sbsA*-S-Layer-Genen

Für die ortsspezifische Insertionsmutagenese des *sbsA*-Gens wurde eine modifizierte Kanamycin-Kassette (1,3 kb) verwendet, die durch Spaltung des Plasmids *pWJC3* (erhalten von W.T. McAllister, New York) durch *Sma*I isoliert wurde. Die Kassette wurde in fünf verschiedene glattendige Restriktionsstellen des *sbsA*-Gens ligiert, nämlich in die *Nru*I-Stelle an Position bp 582 (*pSL582*), in die *Sna*BI-Stelle an bp 917 (*pSL917*) und in jede der *Pvu*II-Stellen an Position bp 878 (*pSL878*), bp 2504 (*pSL2504*) und bp 2649 (*pSL2649*). Nach Selektion von Kanamycinresistenten Klonen wurde die Kassette aus der Insertionsstelle durch Spaltung mit *Apal*, gefolgt von einer Religation des S-Layer-Plasmids *pBK4*, entfernt. Durch die Herausschneide- und Religationsprozedur blieb eine Insertion von 6 bp CCCGGG zurück. Das System dieser Linkerinsertion ist schematisch in Fig. 2 dargestellt.

Die resultierenden rekombinanten S-Layer-Gene kodieren für modifizierte, um 2 Aminosäuren verlängerte *sbsA*-Proteine.

Die konkreten Änderungen in der Primärstruktur der *sbsA*-Proteine sind in Fig. 3 gezeigt. Im Klon *pSL582* führte die Insertion zur Einfügung von Glycin und Prolin zwischen den Aminosäuren 194 und 195 am N-Terminus des *SbsA*-Proteins. Die Aminosäuren Alanin und Arginin wurden im Klon *pSL917* zwischen die Aminosäuren 306 und 307 eingefügt. Im Klon *pSL2649* wurde eine Insertion von Glycin und Prolin zwischen die Aminosäuren an den Positionen 883 und 884 eingefügt. Eine Insertion von Alanin und Prolin zwischen den Aminosäuren 293 und 294 wurde im Klon *pSL878* erhalten. Weiterhin wurde das Alanin an Position 293 durch Glycin ausgetauscht. Im Klon *pSL2504* wurden die Aminosäuren Alanin und Prolin zwischen die Aminosäuren 835 und 836 eingeführt und das Alanin an Position 835 durch Glycin ersetzt.

Alle durch Insertionsmutagenese erhaltenen Klonen behielten ihre Fähigkeit zur Synthese des S-Layer-Proteins.

Um die Fähigkeit der modifizierten Proteine zur Assemblierung in S-Layer-Strukturen nachzuweisen, wurden gemäß der unter Punkt 7. beschriebenen Prozedur ultradünne Längsschnitte von gesamten Zellen, die 4h unter induktiven Bedingungen kultiviert worden waren, hergestellt. Es wurde gefunden, daß das Cytoplasma aller 5 Klonen mit parallelen, blattartigen Strukturen gefüllt ist, welche der Krümmung der Zellpole folgen. Es gab keine morphologischen Unterschiede des Zytosplasma bei den 5 untersuchten verschiedenen Klonen. Es wurden genau die gleichen blattartigen Strukturen wie bei der Assemblierung des Wildtyp-*SbsA*-Protein in *E. coli* (Punkt 7.) festgestellt.

Auf analoge Weise wurde ein mit *Apal*-Linkern versehenes DNA-Fragment (SEQ ID NO. 7) in die Schnittstelle an Position 581 integriert, das für ein Teilfragment von Streptavidin kodiert.

#### 9. Isolierung und Charakterisierung des *sbsB*-Gens

Als Grundlage für die Isolierung des *sbsB*-Gens diente die Aminosäuresequenz des N-Terminus sowie die Sequenz von 3 internen Peptiden des *SbsB*-Proteins. Von diesen Peptidsequenzen ausgehend wurden degenerierte Oligonukleotidprimer konstruiert und für die PCR eingesetzt. Auf diese Weise wurde ein 1076 bp langes PCR-Fragment aus der chromosomal DNA von *B. stearothermophilus* amplifiziert, kloniert und sequenziert (entsprechend Position 100 – 1176 der in SEQ ID NO. 5 gezeigten Sequenz).

Für die Amplifikation der 5'- und 3'-seitigen Abschnitte des *sbsB*-Gens wurde die Methode der inversen PCR angewendet und mit Hilfe verschiedener Primerkombinationen schrittweise überlappende DNA-Fragmente erhalten und sequenziert.

Zur Amplifikation des vollständigen *sbsB*-Gens wurden als Primer der im Sequenzprotokoll als SEQ ID NO. 8 angegebene Primer *NIS 2AG*, der den 5'-Bereich von *sbsB* enthält, sowie der im Sequenzprotokoll in SEQ ID NO. 9 angegebene Primer *LIS C3* verwendet, der den 3'-Bereich von *sbsB* enthält.

Das auf diese Weise erhaltene PCR-Fragment, welches die in SEQ ID NO. 5 gezeigte Nukleotidsequenz mit 5'- und 3'-*Bam*HI-Restriktionsschnittstellen enthält, wurde wie im Beispiel 5 beschrieben in den Vektor *pPLcAT10* kloniert, in dem die Expression unter Kontrolle des Lambda PL-Promotors erfolgte.

Weiterhin wurde das *sbsB*-PCR-Fragment mit 5'-seitiger *Eco*RI- und 3'-seitiger *Bam*HI-Schnittstelle in den Vektor *pUC18* kloniert, in dem die Expression unter Kontrolle des *lac*-Promotors erfolgte.

Der Nachweis der *sbsB*-Expression erfolgte wie in den Beispielen 6 und 7 beschrieben durch SDS-Gelelektro-

phorese und Elektronenmikroskopie.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Werner Lubitz
- (B) STRASSE: Schoenborngasse 12/7
- (C) ORT: Wien
- (E) LAND: Austria
- (F) POSTLEITZAHL: 1080

- (A) NAME: Uwe Sleytr
- (B) STRASSE: Parhamerplatz 10
- (C) ORT: Wien
- (E) LAND: Austria
- (F) POSTLEITZAHL: 1170

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Expression von S-Layer- Proteinen 20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 9

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 3687 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Bacillus stearothermophilus*
- (B) STAMM: PV72

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): sbsA

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE:1..3684

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: sig\_peptide
- (B) LAGE:1..90

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: mat\_peptide
- (B) LAGE:91..3684

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG GAT AGG AAA AAA GCT GTG AAA CTA GCA ACA GCA AGT GCT ATT GCA  
 Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala  
 -30 -25 -20 -15

48

60

65

## DE 196 03 649

GCA AGT GCA TTT GTC GCT GCA AAT CCA AAC GCT TCT GAA GCG GCT ACA Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr -10 -5 1	96
5 GAT GTA GCA ACA GTA GTA AGC CAA GCA AAA GCA CAG TTC AAA AAA GCA Asp Val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala S 10 15	144
10 TAC TAT ACT TAC AGC CAT ACA GTA ACG GAA ACT GGT GAA TTC CCA AAC Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn 20 25 30	192
15 ATT AAC GAT GTA TAT GCT GAA TAC AAC AAA GCG AAA AAA CGA TAC CGT Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg 35 40 45 50	240
20 GAT GCG GTA GCA TTA GTG AAT AAA GCA GGT GGC GCG AAA AAA GAC GCT Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala 55 60 65	288
25 TAC TTA GCT GAT TTA CAA AAA GAA TAT GAA ACT TAC GTT TTC AAA GCA Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala 70 75 80	336
30 AAC CCT AAA TCT GGC GAA GCT CGT GTA GCA ACT TAC ATC GAT GCT TAC Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr 85 90 95	384
35 AAC TAT GCA ACA AAA TTA GAC GAA ATG CGC CAA GAG CTA GAG GCT GCT Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala 100 105 110	432
40 GTT CAA GCA AAA GAT TTA GAA AAA GCA GAA CAA TAC TAT CAC AAA ATT Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile 115 120 125 130	480
45 CCT TAT GAA ATT AAA ACT CGC ACA GTC ATT TTA GAT CGC GTA TAT GGT Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr GLY 135 140 145	528
50 AAA ACA ACT CGT GAT TTA CTT CGC TCT ACA TTT AAA GCA AAA GCA CAA Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Ala Lys Ala Gln 150 155 160	576
55 GAA CTT CGC GAC AGC TTA ATT TAT GAT ATT ACC GTT GCA ATG AAA GCG Glu Leu Arg Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Ile Thr Val Ala Met Lys Ala 165 170 175	624
60 CGC GAA GTA CAA GAC GCT GTG AAA GCA GGC AAT TTA GAC AAA GCT AAA Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys 180 185 190	672
65 GCT GCT GTT GAT CAA ATC AAT CAA TAC TTA CCA AAA GTA ACA GAT GCT Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala 195 200 205 210	720
70 TTC AAA ACT GAA CTA ACA GAA GTA GCG AAA AAA GCA TTA GAT GCA GAT Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp 215 220 225	768
75 GAA GCT GCG CTT ACT CCA AAA GTT GAA AGT GTA AGT GCG ATT AAC ACT Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr 230 235 240	816

## DE 196 03 649 A1

CAA AAC AAA GCT GTT GAA TTA ACA GCA GTA CCA GTG AAC GGA ACA CTA Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu 245 250 255	864
AAA TTA CAA CTT TCA GCT GCA AAT GAA GAT ACA GTA AAC GTA AAT Lys Leu Gln Leu Ser Ala Ala Asn Glu Asp Thr Val Asn Val Asn 260 265 270	912 5
ACT GTA CGT ATC TAT AAA GTG GAC GGT AAC ATT CCA TTT GCC CTT AAT Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn 275 280 285 290	960 10
ACG GCA GAT GTT TCT TTA TCT ACA GAC GGA AAA ACT ATC ACT GTG GAT Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp 295 300 305	1008 15
GCT TCA ACT CCA TTC GAA AAT AAT ACG GAG TAT AAA GTA GTA GTT AAA Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys 310 315 320	1056
GGT ATT AAA GAC AAA AAT GCC AAA GAA TTT AAA GAA GAT GCA TTC ACT Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr 325 330 335	1104 20
TTC AAG CTT CGA AAT GAT GCT GTA GTT ACT CAA GTG TTT GGA ACT AAT Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn 340 345 350	1152 25
GTA ACA AAC AAC ACT TCT GTA AAC TTA GCA GCA GGT ACT TTC GAC ACT Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr 355 360 365 370	1200 30
GAC GAT ACT TTA ACA GTA GTA TTT GAT AAG TTG TTA GCA CCT GAA ACT Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr 375 380 385	1248
GTA AAC AGC TCG AAC GTT ACT ATT ACA GAT GTT GAA ACT GGA AAA CGC Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg 390 395 400	1296 35
ATT CCA GTA ATT GCA TCT ACT TCT GGT TCT ACA ATT ACT ATT ACG TTA Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu 405 410 415	1344 40
AAA GAA GCG TTA GTA ACT GGT AAA CAA TAT AAA CTT GCT ATC AAT AAT Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn 420 425 430	1392 45
GTT AAA ACA TTA ACT GGT TAC AAT GCA GAA GCT TAC GAG TTA GTG TTC Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe 435 440 445 450	1440
ACT GCA AAC GCA TCA GCA CCA ACT GTT GCT ACC CCT ACT ACT TTA Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu 455 460 465	1488 50
GGT GGT ACA ACT TTA TCT ACT GGT TCT CTT ACA ACA AAT GTT TGG GGT Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly 470 475 480	1536 55
AAA TTG GCT GGT GGT GTG AAT GAA GCT GGA ACT TAT TAT CCT GGT CTT Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu 485 490 495	1584 60

DE 196 03 649

	CAA TTC ACA ACA ACG TTT GCT ACT AAG TTA GAC GAA TCT ACT TTA GCT Gln Phe Thr Thr Phe Ala Thr Lys Leu Asp Glu Ser Thr Leu Ala 500 505 510	1632
5	GAT AAC TTT GTA TTA GTT GAA AAA GAA TCT GGT ACA GTT GTT GCT TCT Asp Asn Phe Val Leu Val Glu Lys Glu Ser Gly Thr Val Val Ala Ser 515 520 525 530	1680
10	GAA CTA AAA TAT AAT GCA GAC GCT AAA ATG GTA ACT TTA GTG CCA AAA Glu Leu Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Lys Met Val Thr Leu Val Pro Lys 535 540 545	1728
15	GCG GAC CTT AAA GAA AAT ACA ATC TAT CAA ATC AAA ATT AAA AAA GGC Ala Asp Leu Lys Glu Asn Thr Ile Tyr Gln Ile Lys Ile Lys Lys Gly 550 555 560	1776
20	TTG AAG TCC GAT AAA GGT ATT GAA TTA GGC ACT GTT AAC GAG AAA ACA Leu Lys Ser Asp Lys Gly Ile Glu Leu Gly Thr Val Asn Glu Lys Thr 565 570 575	1824
25	TAT GAG TTC AAA ACT CAA GAC TTA ACT GCT CCT ACA GTT ATT AGC GTA Tyr Glu Phe Lys Thr Gln Asp Leu Thr Ala Pro Thr Val Ile Ser Val 580 585 590	1872
30	ACG TCT AAA AAT GGC GAC GCT GGA TTA AAA GTA ACT GAA GCT CAA GAA Thr Ser Lys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Lys Val Thr Glu Ala Gln Glu 595 600 605 610	1920
35	TTT ACT GTG AAG TTC TCA GAG AAT TTA AAT ACA TTT AAT GCT ACA ACC Phe Thr Val Lys Phe Ser Glu Asn Leu Asn Thr Phe Asn Ala Thr Thr 615 620 625	1968
40	GTT TCG GGT AGC ACA ATC ACA TAC GGT CAA GTT GCT GTA GTA AAA GCG Val Ser Gly Ser Thr Ile Thr Tyr Gly Gln Val Ala Val Val Lys Ala 630 635 640	2016
45	GGT GCA AAC TTA TCT GCT CTT ACA GCA AGT GAC ATC ATT CCA GCT AGT Gly Ala Asn Leu Ser Ala Leu Thr Ala Ser Asp Ile Ile Pro Ala Ser 645 650 655	2064
50	GTT GAA GCG GTT ACT GGT CAA GAT GGA ACA TAC AAA GTG AAA GTT GCT Val Glu Ala Val Thr Gly Gln Asp Gly Thr Tyr Lys Val Lys Val Ala 660 665 670	2112
55	GCT AAC CAA TTA GAA CGT AAC CAA GGG TAC AAA TTA GTA GTG TTC GGT Ala Asn Gln Leu Glu Arg Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Val Val Phe Gly 675 680 685 690	2160
60	AAA GGT GCA ACA GCT CCT GTT AAA GAT GCT GCA AAT GCA AAT ACT TTA Lys Gly Ala Thr Ala Pro Val Lys Asp Ala Ala Asn Ala Asn Thr Leu 695 700 705	2208
65	GCA ACT AAC TAT ATC TAT ACA TTT ACA ACT GAA GGT CAA GAC GTA ACA Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Thr Phe Thr Glu Gly Gln Asp Val Thr 710 715 720	2256
70	GCA CCA ACG GTT ACA AAA GTA TTC AAA GGT GAT TCT TTA AAA GAC GCT Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala 725 730 735	2304
75	GAT GCA GTT ACT ACA CTT ACG AAC GTT GAT GCA GGT CAA AAA TTC ACT Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr 740 745 750	2352

ATC CAA TTT AGC GAA GAA TTA AAA ACT TCT AGT GGT TCT TTA GTG GGT Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly 755 760 765 770	2400
GGC AAA GTA ACT GTC GAG AAA TTA ACA AAC GGA TGG GTA GAT GCT Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala 775 780 785	2443 5
GGT ACT GGA ACA ACT GTA TCA GTT GCT CCT AAG ACA GAT GCA AAT GGT Gly Thr Gly Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly 790 795 800	2496 10
AAA GTA ACA GCT GCT GTG GTT ACA TTA ACT GGT CTT GAC AAT AAC GAC Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp 805 810 815	2544 15
AAA GAT GCG AAA TTG CGT CTG GTA GTA GAT AAG TCT TCT ACT GAT GGA Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly 820 825 830	2592
ATT GCT GAT GTA GCT GGT AAT GTA ATT AAG GAA AAA GAT ATT TTA ATT Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile 835 840 845 850	2640 20
CGT TAC AAC AGC TGG AGA CAC ACT GTA GCT TCT GTG AAA GCT GCT GCT Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala 855 860 865	2688 25
GAC AAA GAT GGT CAA AAC GCT TCT GCT GCA TTC CCA ACA AGC ACT GCA Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Ala Ala Phe Pro Thr Ser Thr Ala 870 875 880	2736 30
ATT GAT ACA ACT AAG AGC TTA TTA GTT GAA TTC AAT GAA ACT GAT TTA Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu 885 890 895	2784
CGC GAA GTT AAA CCT GAG AAC ATC GTT GTT AAA GAT GCA GCA GGT AAT Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn 900 905 910	2832 35
GCG GTA GCT GGT ACT GTA ACA GCA TTA GAC GGT TCT ACA AAT AAA TTT Ala Val Ala Gly Thr Val Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe 915 920 925 930	2880 40
GTA TTC ACT CCA TCT CAA GAA TTA AAA GCT GGT ACA GCA GTT TAC TCT GTA Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val 935 940 945	2928 45
ACA ATT GAC GGT GTG AGA GAT AAA GTA GGT AAC ACA ATC TCT AAA TAC Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr 950 955 960	2976
ATT ACT TCG TTC AAG ACT GTA TCT GCG AAT CCA ACG TTA TCT TCA ATC Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile 965 970 975	3024 50
AGC ATT GCT GAC GGT GCA GTT AAC GTT GAC CGT TCT AAA ACA ATT ACA Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr 980 985 990	3072 55
ATT GAA TTC AGC GAT TCA GTT CCA AAC CCA ACA ATC ACT CTT AAG AAG Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys 995 1000 1005 1010	3120 60

	GCT GAC GGA ACT TCA TTT ACT AAT TAC ACT TTA GTA AAT GTA AAT AAT Ala Asp Gly Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Thr Leu Val Asn Val Asn Asn 1015 1020 1025	3153
5	GAA AAT AAA ACA TAC AAA ATT GTA TTC CAC AAA GGT GTA ACA CTT GAC Glu Asn Lys Thr Tyr Lys Ile Val Phe His Lys Gly Val Thr Leu Asp 1030 1035 1040	3216
10	GAG TTT ACT CAA TAT GAG TTA GCA GTT TCA AAA GAT TTT CAA ACT GGT Glu Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala Val Ser Lys Asp Phe Gln Thr Gly 1045 1050 1055	3264
15	ACT GAT ATT GAT AGC AAA GTT ACA TTC ATC ACA GGT TCT GTT GCT ACT Thr Asp Ile Asp Ser Lys Val Thr Phe Ile Thr Gly Ser Val Ala Thr 1060 1065 1070	3312
20	GAC GAA GTA AAA CCT GCT CTA GTA GGC GTT GGT TCA TGG AAT GGA ACA Asp Glu Val Lys Pro Ala Leu Val Gly Val Gly Ser Trp Asn Gly Thr 1075 1080 1085 1090	3360
25	AGC TAT ACT CAG GAT GCT GCA GCA ACA CGA CTT CGG TCT GTA GCT GAC Ser Tyr Thr Gln Asp Ala Ala Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Asp 1095 1100 1105	3408
30	TTC GTT GCG GAG CCA GTT GCC CTT CAA TTC TCA GAA GGT ATC GAT TTA Phe Val Ala Glu Pro Val Ala Leu Gln Phe Ser Glu Gly Ile Asp Leu 1110 1115 1120	3456
35	ACG AAT GCA ACT GTG ACA GTA ACA AAT ATT ACT GAT GAT AAA ACT GTT Thr Asn Ala Thr Val Thr Asn Ile Thr Asp Asp Lys Thr Val 1125 1130 1135	3504
40	GAA GTT ATT TCA AAA GAG AGT GTA GAC GCA GAC CAT GAT GCA CGT GCT Glu Val Ile Ser Lys Glu Ser Val Asp Ala Asp His Asp Ala Gly Ala 1140 1145 1150	3552
45	ACT AAG GAG ACA TTA GTA ATT AAC ACA GTT ACT CCT TTA GTA CTT GAT Thr Lys Glu Thr Leu Val Ile Asn Thr Val Thr Pro Leu Val Leu Asp 1155 1160 1165 1170	3600
50	AAC AGC AAG ACT TAT AAG ATT GTT GTA AGT GGA GTT AAA GAT GCA GCA Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala 1175 1180 1185	3648
55	GGT AAT GTT GCA GAT ACT ATT ACA TTC TAT ATT AAG TAA Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys 1190 1195	3687

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

50	(i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LÄNGE: 1228 Aminosäuren (B) ART: Aminosäure (D) TOPOLOGIE: linear	
55	(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:	
	Met Asp Arg Lys Lys Ala Val Lys Leu Ala Thr Ala Ser Ala Ile Ala -30 -25 -20 -15	
60	Ala Ser Ala Phe Val Ala Ala Asn Pro Asn Ala Ser Glu Ala Ala Thr -10 -5 1	

Asp Val Ala Thr Val Val Ser Gln Ala Lys Ala Gln Phe Lys Lys Ala			
5	10	15	
Tyr Tyr Thr Tyr Ser His Thr Val Thr Glu Thr Gly Glu Phe Pro Asn			
20	25	30	5
Ile Asn Asp Val Tyr Ala Glu Tyr Asn Lys Ala Lys Lys Arg Tyr Arg			
35	40	45	50
Asp Ala Val Ala Leu Val Asn Lys Ala Gly Gly Ala Lys Lys Asp Ala			
55	60	65	10
Tyr Leu Ala Asp Leu Gln Lys Glu Tyr Glu Thr Tyr Val Phe Lys Ala			
70	75	80	
Asn Pro Lys Ser Gly Glu Ala Arg Val Ala Thr Tyr Ile Asp Ala Tyr			
85	90	95	15
Asn Tyr Ala Thr Lys Leu Asp Glu Met Arg Gln Glu Leu Glu Ala Ala			
100	105	110	20
Val Gln Ala Lys Asp Leu Glu Lys Ala Glu Gln Tyr Tyr His Lys Ile			
115	120	125	130
Pro Tyr Glu Ile Lys Thr Arg Thr Val Ile Leu Asp Arg Val Tyr Gly			
135	140	145	25
Lys Thr Thr Arg Asp Leu Leu Arg Ser Thr Phe Lys Ala Lys Ala Gln			
150	155	160	
Glu Leu Arg Asp Ser Leu Ile Tyr Asp Ile Thr Val Ala Met Lys Ala			
165	170	175	30
Arg Glu Val Gln Asp Ala Val Lys Ala Gly Asn Leu Asp Lys Ala Lys			
180	185	190	
Ala Ala Val Asp Gln Ile Asn Gln Tyr Leu Pro Lys Val Thr Asp Ala			
195	200	205	210
Phe Lys Thr Glu Leu Thr Glu Val Ala Lys Lys Ala Leu Asp Ala Asp			
215	220	225	
Glu Ala Ala Leu Thr Pro Lys Val Glu Ser Val Ser Ala Ile Asn Thr			
230	235	240	
Gln Asn Lys Ala Val Glu Leu Thr Ala Val Pro Val Asn Gly Thr Leu			
245	250	255	45
Lys Leu Gln Leu Ser Ala Ala Ala Asn Glu Asp Thr Val Asn Val Asn			
260	265	270	
Thr Val Arg Ile Tyr Lys Val Asp Gly Asn Ile Pro Phe Ala Leu Asn			
275	280	285	290
Thr Ala Asp Val Ser Leu Ser Thr Asp Gly Lys Thr Ile Thr Val Asp			
295	300	305	
Ala Ser Thr Pro Phe Glu Asn Asn Thr Glu Tyr Lys Val Val Val Lys			
310	315	320	55
Gly Ile Lys Asp Lys Asn Gly Lys Glu Phe Lys Glu Asp Ala Phe Thr			
325	330	335	
			60

Phe Lys Leu Arg Asn Asp Ala Val Val Thr Gln Val Phe Gly Thr Asn  
 340 345 350  
 Val Thr Asn Asn Thr Ser Val Asn Leu Ala Ala Gly Thr Phe Asp Thr  
 355 360 365 370  
 Asp Asp Thr Leu Thr Val Val Phe Asp Lys Leu Leu Ala Pro Glu Thr  
 375 380 385  
 Val Asn Ser Ser Asn Val Thr Ile Thr Asp Val Glu Thr Gly Lys Arg  
 390 395 400  
 Ile Pro Val Ile Ala Ser Thr Ser Gly Ser Thr Ile Thr Ile Thr Leu  
 405 410 415  
 Lys Glu Ala Leu Val Thr Gly Lys Gln Tyr Lys Leu Ala Ile Asn Asn  
 420 425 430  
 Val Lys Thr Leu Thr Gly Tyr Asn Ala Glu Ala Tyr Glu Leu Val Phe  
 435 440 445 450  
 Thr Ala Asn Ala Ser Ala Pro Thr Val Ala Thr Ala Pro Thr Thr Leu  
 455 460 465  
 Gly Gly Thr Thr Leu Ser Thr Gly Ser Leu Thr Thr Asn Val Trp Gly  
 470 475 480  
 Lys Leu Ala Gly Gly Val Asn Glu Ala Gly Thr Tyr Tyr Pro Gly Leu  
 485 490 495  
 Gln Phe Thr Thr Phe Ala Thr Lys Leu Asp Glu Ser Thr Leu Ala  
 500 505 510  
 Asp Asn Phe Val Leu Val Glu Lys Glu Ser Gly Thr Val Val Ala Ser  
 515 520 525 530  
 Glu Leu Lys Tyr Asn Ala Asp Ala Lys Met Val Thr Leu Val Pro Lys  
 535 540 545  
 Ala Asp Leu Lys Glu Asn Thr Ile Tyr Gln Ile Lys Ile Lys Gly  
 550 555 560  
 Leu Lys Ser Asp Lys Gly Ile Glu Leu Gly Thr Val Asn Glu Lys Thr  
 565 570 575  
 Tyr Glu Phe Lys Thr Gln Asp Leu Thr Ala Pro Thr Val Ile Ser Val  
 580 585 590  
 Thr Ser Lys Asn Gly Asp Ala Gly Leu Lys Val Thr Glu Ala Gln Glu  
 595 600 605 610  
 Phe Thr Val Lys Phe Ser Glu Asn Leu Asn Thr Phe Asn Ala Thr Thr  
 615 620 625  
 Val Ser Gly Ser Thr Ile Thr Tyr Gly Gln Val Ala Val Val Lys Ala  
 630 635 640  
 Gly Ala Asn Leu Ser Ala Leu Thr Ala Ser Asp Ile Ile Pro Ala Ser  
 645 650 655  
 Val Glu Ala Val Thr Gly Gln Asp Gly Thr Tyr Lys Val Lys Val Ala  
 660 665 670

## DE 196 03 649 A1

Ala Asn Gln Leu Glu Arg Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Val Val Phe Gly  
 675 680 685 690  
 Lys Gly Ala Thr Ala Pro Val Lys Asp Ala Ala Asn Ala Asn Thr Leu  
 695 700 705 5  
 Ala Thr Asn Tyr Ile Tyr Thr Phe Thr Thr Glu Gly Gln Asp Val Thr  
 710 715 720  
 Ala Pro Thr Val Thr Lys Val Phe Lys Gly Asp Ser Leu Lys Asp Ala  
 725 730 735 10  
 Asp Ala Val Thr Thr Leu Thr Asn Val Asp Ala Gly Gln Lys Phe Thr  
 740 745 750  
 Ile Gln Phe Ser Glu Glu Leu Lys Thr Ser Ser Gly Ser Leu Val Gly  
 755 760 765 770 15  
 Gly Lys Val Thr Val Glu Lys Leu Thr Asn Asn Gly Trp Val Asp Ala  
 775 780 785 20  
 Gly Thr Gly Thr Thr Val Ser Val Ala Pro Lys Thr Asp Ala Asn Gly  
 790 795 800  
 Lys Val Thr Ala Ala Val Val Thr Leu Thr Gly Leu Asp Asn Asn Asp  
 805 810 815 25  
 Lys Asp Ala Lys Leu Arg Leu Val Val Asp Lys Ser Ser Thr Asp Gly  
 820 825 830  
 Ile Ala Asp Val Ala Gly Asn Val Ile Lys Glu Lys Asp Ile Leu Ile  
 835 840 845 850 30  
 Arg Tyr Asn Ser Trp Arg His Thr Val Ala Ser Val Lys Ala Ala Ala  
 855 860 865  
 Asp Lys Asp Gly Gln Asn Ala Ser Ala Ala Phe Pro Thr Ser Thr Ala  
 870 875 880 35  
 Ile Asp Thr Thr Lys Ser Leu Leu Val Glu Phe Asn Glu Thr Asp Leu  
 885 890 895 40  
 Ala Glu Val Lys Pro Glu Asn Ile Val Val Lys Asp Ala Ala Gly Asn  
 900 905 910  
 Ala Val Ala Gly Thr Val Thr Ala Leu Asp Gly Ser Thr Asn Lys Phe  
 915 920 925 930 45  
 Val Phe Thr Pro Ser Gln Glu Leu Lys Ala Gly Thr Val Tyr Ser Val  
 935 940 945  
 Thr Ile Asp Gly Val Arg Asp Lys Val Gly Asn Thr Ile Ser Lys Tyr  
 950 955 960 50  
 Ile Thr Ser Phe Lys Thr Val Ser Ala Asn Pro Thr Leu Ser Ser Ile  
 965 970 975  
 Ser Ile Ala Asp Gly Ala Val Asn Val Asp Arg Ser Lys Thr Ile Thr  
 980 985 990 55  
 Ile Glu Phe Ser Asp Ser Val Pro Asn Pro Thr Ile Thr Leu Lys Lys  
 995 1000 1005 1010 60  
 Ala Asp Gly Thr Ser Phe Thr Asn Tyr Thr Leu Val Asn Val Asn Asn  
 1015 1020 1025  
 65

Glu Asn Lys Thr Tyr Lys Ile Val Phe His Lys Gly Val Thr Leu Asp  
 1030 1035 1040  
 Glu Phe Thr Gln Tyr Glu Leu Ala Val Ser Lys Asp Phe Gln Thr Gly  
 5 1045 1050 1055  
 Thr Asp Ile Asp Ser Lys Val Thr Phe Ile Thr Gly Ser Val Ala Thr  
 1060 1065 1070  
 Asp Glu Val Lys Pro Ala Leu Val Gly Val Gly Ser Trp Asn Gly Thr  
 1075 1080 1085 1090  
 Ser Tyr Thr Gln Asp Ala Ala Ala Thr Arg Leu Arg Ser Val Ala Asp  
 1095 1100 1105  
 15 Phe Val Ala Glu Pro Val Ala Leu Gln Phe Ser Glu Gly Ile Asp Leu  
 1110 1115 1120  
 Thr Asn Ala Thr Val Thr Val Thr Asn Ile Thr Asp Asp Lys Thr Val  
 20 1125 1130 1135  
 Glu Val Ile Ser Lys Glu Ser Val Asp Ala Asp His Asp Ala Gly Ala  
 1140 1145 1150  
 Thr Lys Glu Thr Leu Val Ile Asn Thr Val Thr Pro Leu Val Leu Asp  
 25 1155 1160 1165 1170  
 Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Ile Val Val Ser Gly Val Lys Asp Ala Ala  
 1175 1180 1185  
 30 Gly Asn Val Ala Asp Thr Ile Thr Phe Tyr Ile Lys  
 1190 1195

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

35 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 33 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

40

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

45 TTAATCGATT CTAGATGGAT AGGAAAAAAG CTG

33

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 37 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

55

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

60

65

ATACCCGGGG GTACGGATCC GATACAGATT TGAGCAA

37

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 2766 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: beides
- (D) TOPOLOGIE: linear

5

10

## (vi) URSPRÜNLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Bacillus stearothermophilus*
- (B) STAMM: PV72

15

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (B) CLON(E): *sbsB*

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..2763

20

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: *sig\_peptide*
- (B) LAGE: 1..93

25

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: *mat\_peptide*
- (B) LAGE: 94..2763

30

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

ATG GCT TAT CAA CCT AAG TCT TTT CGC AAG TTT GTT GCG ACA ACT GCA	48	
Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala		
-31 -30	-25	-20

35

ACA GCT GCC ATT GTA GCA TCT GCG GTA GCT CCT GTA GTA TCT GCA GCA	96		
Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala			
-15	-10	-5	1

AGC TTC ACA GAT GTT GCG CCG CAA TAT AAA GAT GCG ATC GAT TTC TTA	144	40
Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu		
5	10	15

GTA TCA ACT GGT GCA ACA AAA GGT AAA ACA GAA ACA AAA TTC GGC GTT	192	45
Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val		
20	25	30

TAC GAT GAA ATC ACT CGT CTA GAT GCG GCA GTT ATT CTT GCA AGA GTA	240	
Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val		
35	40	45

50

TTA AAA CTA GAC GTT GAC AAC GCA AAA GAC GCA GGC TTC ACA GAT GTG	288		
Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val			
50	55	60	65

55

CCA AAA GAC CGT GCA AAA TAC GTC AAC GCG CTT GTA GAA GCT GGC GTA	336	
Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val		
70	75	80

TTA AAC GGT AAA GCA CCT GGC AAA TTT GGT GCA TAC GAC CCA TTA ACT	384	60
Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr		
85	90	95

65

## DE 196 03 649

CGC GTT GAA ATG GCA AAA ATC ATC GCG AAC CGT TAC AAA TTA AAA GCT Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala 100 105 110	432
5 GAC GAT GTA AAA CTT CCA TTC ACT GAT GTA AAC GAT ACA TGG GCA CCA Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro 115 120 125	480
10 TAC GTA AAA GCG CTT TAT AAA TAC GAA GTA ACC AAA AGG TTA AAA CAC Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His 130 135 140 145	528
15 CAA CAA GCT TCG GTG CAT ACC AAA AAC ATC ACT CTG CGT GAC TTT GCG Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala 150 155 160	576
20 CAA TTT GTA TAT AGA GCG GTG AAT ATT AAT GCA GTG CCA GAA ATA GTT Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val 165 170 175	624
25 CAA ATT GCT GAT GTT GAT TTC ACA AAT TTT GCT ATC GAT AAC GGT TTA Gln Ile Ala Asp Val Asp Phe Thr Asn Phe Ala Ile Asp Asn Gly Leu 195 200 205	720
30 ACT GTT ACT AAA GCA ACT CTT TCT CGT GAT AAA AAA TCC GTA GAG GTT Thr Val Thr Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Lys Ser Val Glu Val 210 215 220 225	768
35 GTG GTA AAT AAA CCG TTT ACT CGT AAT CAG GAA TAT ACA ATT ACA GCG Val Val Asn Lys Pro Phe Thr Arg Asn Gln Glu Tyr Thr Ile Thr Ala 230 235 240	816
40 ACA GGC ATT AAA AAT TTA AAA GGC GAG ACC GCT AAG GAA TTA ACT GGT Thr Gly Ile Lys Asn Leu Lys Gly Glu Thr Ala Lys Glu Leu Thr Gly 245 250 255	864
45 AAG TTT GTT TGG TCT GTT CAA GAT GCG GTA ACT GTT GCA CTA AAT AAT Lys Phe Val Trp Ser Val Gln Asp Ala Val Thr Val Ala Leu Asn Asn 260 265 270	912
50 AGT TCG CTT AAA GTT GGA GAG GAA TCT GGT TTA ACT GTA AAA GAT CAG Ser Ser Leu Lys Val Gly Glu Ser Gly Leu Thr Val Lys Asp Gln 275 280 285	960
55 GAT GGC AAA GAT GTT GTA GGT GCT AAA GTA GAA CTT ACT TCT TCT AAT Asp Gly Lys Asp Val Val Gly Ala Lys Val Glu Leu Thr Ser Ser Asn 290 295 300 305	1008
60 ACT AAT ATT GTT GTA GTT TCA AGT GGC GAA GTA TCA GTA TCT GCT GCT Thr Asn Ile Val Val Ser Ser Gly Glu Val Ser Val Ser Ala Ala 310 315 320	1056
65 AAA GTT ACA GCT GTA AAA CCG GGA ACA GCT GAT GTT ACT GCA AAA GTT Lys Val Thr Ala Val Lys Pro Gly Thr Ala Asp Val Thr Ala Lys Val 325 330 335	1104
70 ACA TTA CCA GAT GGT GTT GTA CTA ACA AAT ACA TTT AAA GTG ACA GTT Thr Leu Pro Asp Gly Val Val Leu Thr Asn Thr Phe Lys Val Thr Val 340 345 350	1152

ACA GAA GTG CCT GTT CAA GTC CAA AAT CAA GGA TTT ACT TTA GTT GAT	1200
Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp	
355 360 365	
AAT CTT TCT AAT GCT CCA CAG AAT ACA GTT GCA TTT AAC AAA GCT GAG	1248 5
Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu	
370 375 380 385	
AAA GTA ACT TCA ATG TTT GCT GGA GAA ACT AAA ACA GTT GCA ATG TAT	1296
Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr	10
390 395 400	
GAT ACT AAA AAC GGT CCT GAA ACT AAA CCT GTT GAT TTC AAA GAT	1344
Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp	
405 410 415	15
GCA ACT GTA CGT TCA TTA AAT CCA ATT ATT GCA ACA GCT GCT ATT AAT	1392
Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn	
420 425 430	
GGT AGT GAG CTC CTT GTC ACA GCT AAT GCT GGC CAA TCT GGA AAA GCT	1440 20
Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala	
435 440 445	
TCA TTT GAA GTA ACA TTA AAA GAT AAT ACA AAA AGA ACA TTT ACA GTT	1488 25
Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val	
450 455 460 465	
GAT GTA AAA AAA GAC CCT GTA TTA CAA GAT ATA AAA GTA GAT GCA ACT	1536
Asp Val Lys Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr	30
470 475 480	
TCT GTT AAA CTT TCC GAT GAA GCT GTT GGC GGC GGG GAA GTT GAA GGA	1584
Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Glu Val Glu Gly	
485 490 495	
GTT AAC CAA AAA ACG ATT AAA GTA AGT GCA GTT GAC CAA TAC GGT AAA	1632
Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys	
500 505 510	35
GAA ATT AAA TTT GGT ACA AAA GGT AAA GTT ACT GTT ACA ACT AAT ACA	1680 40
Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Thr Asn Thr	
515 520 525	
GAA GGA CTA GTT ATT AAA AAT GTA AAT AGC GAT AAT ACA ATT GAC TTT	1728
Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe	45
530 535 540 545	
GAT AGC GGC AAT AGT GCA ACT GAC CAA TTT GTT GTC GTT GCA ACA AAA	1776
Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys	
550 555 560	50
GAC AAA ATT GTC AAT GGT AAA GTA GAA GTT AAA TAT TTC AAA AAT GCT	1824
Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala	
565 570 575	
AGT GAC ACA ACA CCA ACT TCA ACT AAA ACA ATT ACT GTT AAT GTA GTA	1872 55
Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val	
580 585 590	
AAT GTA AAA GCT GAC GCT ACA CCA GTA GGA TTA GAT ATT GTA GCA CCT	1920
Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro	60
595 600 605	65

## DE 196 03 649

610	TCT AAA ATT GAT GTA AAT GCT CCA AAC ACT GCT TCT ACT GCA GAT GTT Ser Lys Ile Asp Val Asn Ala Pro Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asp Val 615	620	625	1968	
5	GAT TTT ATA AAT TTC GAA AGT GTT GAG ATT TAC ACA CTC GAT TCA AAT Asp Phe Ile Asn Phe Glu Ser Val Glu Ile Tyr Thr Leu Asp Ser Asn 630	635	640	2016	
10	GGT AGA CGT CAA AAA AAA GTT ACT CCA ACT GCA ACT ACA CTT GTA GGT Gly Arg Arg Gln Lys Lys Val Thr Pro Thr Ala Thr Thr Leu Val Gly 645	650	655	2064	
15	ACA AAA AAA AAA AAA GTT AAT GGG AAT GTA TTA CAA TTC AAG GGG Thr Lys Lys Lys Lys Val Asn Gly Asn Val Leu Gln Phe Lys Gly 660	665	670	2112	
20	AAC GAA GAA TTA ACG CTA TCA ACT TCT TCT AGT ACA GGA AAC GTA GAT Asn Glu Glu Leu Thr Leu Ser Thr Ser Ser Thr Gly Asn Val Asp 675	680	685	2160	
25	GGA ACA GCA GAA GGA ATG ACA AAA CGT ATT CCA GGG AAA TAT ATC AAC Gly Thr Ala Glu Gly Met Thr Lys Arg Ile Pro Gly Lys Tyr Ile Asn 690	695	700	705	2208
30	TCT GCA AGT GTA CCT GCC AGT GCA ACA GTA GCA ACA AGT CCT GTT ACT Ser Ala Ser Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Ala Thr Ser Pro Val Thr 710	715	720	2256	
35	GTA AAG CTT AAT TCA AGT GAT AAT GAT TTA ACA TTT GAA GAA TTA ATA Val Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asn Asp Leu Thr Phe Glu Leu Ile 725	730	735	2304	
40	TTC GGT GTA ATT GAC CCT ACA CAA TTA GTC AAA GAT GAA GAC ATC AAC Phe Gly Val Ile Asp Pro Thr Gln Leu Val Lys Asp Glu Asp Ile Asn 740	745	750	2352	
45	GAA TTT ATT GCA GTT TCA AAA GCG GCT AAA AAT GAT GGA TAT TTG TAT Glu Phe Ile Ala Val Ser Lys Ala Ala Lys Asn Asp Gly Tyr Leu Tyr 755	760	765	2400	
50	AAT AAA CCG CTT GTA ACG GTT AAA GAT GCA TCA GGA AAA GTT ATT CCA Asn Lys Pro Leu Val Thr Val Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Pro 770	775	780	785	2448
55	ACA GGT GCA AAT GTT TAC GGT CTA AAT CAT GAT GCA ACT AAC GGA AAC Thr Gly Ala Asn Val Tyr Gly Leu Asn His Asp Ala Thr Asn Gly Asn 790	795	800	2496	
60	ATT TGG TTT GAT GAG GAA CAA GCT GGC TTA GCT AAA AAA TTT AGT GAT Ile Trp Phe Asp Glu Glu Gln Ala Gly Leu Ala Lys Lys Phe Ser Asp 805	810	815	2544	
65	GTA CAT TTT GAT GTT GAT TTT TCA TTA ACT AAC GTT GTA AAA ACT GGT Val His Phe Asp Val Asp Phe Ser Leu Thr Asn Val Val Lys Thr Gly 820	825	830	2592	
70	AGC GGT ACA GTT TCT TCA TCG CCA TCA TTA TCT GAC GCA ATT CAA CTT Ser Gly Thr Val Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp Ala Ile Gln Leu 835	840	845	2640	
75	ACT AAT TCA GGC GAT GCA GTA TCG TTT ACA TTA GTT ATC AAA TCA ATT 850	855	860	865	2688

TAT GTT AAA GGC GCA GAT AAA GAT GAT AAT AAC TTA CTT GCA GCC CCT Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro 370 875 880	2736
GTG TCT GTC AAT GTG ACT GTG ACA AAA TAA Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys 885 890	2766 5
 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 921 Aminosäuren	
(B) ART: Aminosäure	
(D) TOPOLOGIE: linear	
15	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:	
Met Ala Tyr Gln Pro Lys Ser Phe Arg Lys Phe Val Ala Thr Thr Ala -31 -30 -25 -20	20
Thr Ala Ala Ile Val Ala Ser Ala Val Ala Pro Val Val Ser Ala Ala -15 -10 -5 1	
Ser Phe Thr Asp Val Ala Pro Gln Tyr Lys Asp Ala Ile Asp Phe Leu 5 10 15	25
Val Ser Thr Gly Ala Thr Lys Gly Lys Thr Glu Thr Lys Phe Gly Val 20 25 30	
Tyr Asp Glu Ile Thr Arg Leu Asp Ala Ala Val Ile Leu Ala Arg Val 35 40 45	30
Leu Lys Leu Asp Val Asp Asn Ala Lys Asp Ala Gly Phe Thr Asp Val 50 55 60 65	35
Pro Lys Asp Arg Ala Lys Tyr Val Asn Ala Leu Val Glu Ala Gly Val 70 75 80	
Leu Asn Gly Lys Ala Pro Gly Lys Phe Gly Ala Tyr Asp Pro Leu Thr 85 90 95	40
Arg Val Glu Met Ala Lys Ile Ile Ala Asn Arg Tyr Lys Leu Lys Ala 100 105 110	
Asp Asp Val Lys Leu Pro Phe Thr Asp Val Asn Asp Thr Trp Ala Pro 115 120 125	45
Tyr Val Lys Ala Leu Tyr Lys Tyr Glu Val Thr Lys Arg Leu Lys His 130 135 140 145	
Gln Gln Ala Ser Val His Thr Lys Asn Ile Thr Leu Arg Asp Phe Ala 150 155 160	50
Gln Phe Val Tyr Arg Ala Val Asn Ile Asn Ala Val Pro Glu Ile Val 165 170 175	55
Glu Val Thr Ala Val Asn Ser Thr Thr Val Lys Val Thr Phe Asn Thr 180 185 190	
Gln Ile Ala Asp Val Asp Phe Thr Asn Phe Ala Ile Asp Asn Gly Leu 195 200 205	60
65	

0  
 Thr Val Thr Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Lys Lys Ser Val Glu Val  
 210 215 220 225  
 Val Val Asn Lys Pro Phe Thr Arg Asn Gln Glu Tyr Thr Ile Thr Ala  
 5 230 235 240  
 Thr Gly Ile Lys Asn Leu Lys Gly Glu Thr Ala Lys Glu Leu Thr Gly  
 245 250 255  
 Lys Phe Val Trp Ser Val Gln Asp Ala Val Thr Val Ala Leu Asn Asn  
 10 260 265 270  
 Ser Ser Leu Lys Val Gly Glu Glu Ser Gly Leu Thr Val Lys Asp Gln  
 15 275 280 285  
 Asp Gly Lys Asp Val Val Gly Ala Lys Val Glu Leu Thr Ser Ser Asn  
 290 295 300 305  
 Thr Asn Ile Val Val Val Ser Ser Gly Glu Val Ser Val Ser Ala Ala  
 20 310 315 320  
 Lys Val Thr Ala Val Lys Pro Gly Thr Ala Asp Val Thr Ala Lys Val  
 325 330 335  
 Thr Leu Pro Asp Gly Val Val Leu Thr Asn Thr Phe Lys Val Thr Val  
 25 340 345 350  
 Thr Glu Val Pro Val Gln Val Gln Asn Gln Gly Phe Thr Leu Val Asp  
 30 355 360 365  
 Asn Leu Ser Asn Ala Pro Gln Asn Thr Val Ala Phe Asn Lys Ala Glu  
 370 375 380 385  
 Lys Val Thr Ser Met Phe Ala Gly Glu Thr Lys Thr Val Ala Met Tyr  
 35 390 395 400  
 Asp Thr Lys Asn Gly Asp Pro Glu Thr Lys Pro Val Asp Phe Lys Asp  
 40 405 410 415  
 Ala Thr Val Arg Ser Leu Asn Pro Ile Ile Ala Thr Ala Ala Ile Asn  
 40 420 425 430  
 Gly Ser Glu Leu Leu Val Thr Ala Asn Ala Gly Gln Ser Gly Lys Ala  
 45 435 440 445  
 Ser Phe Glu Val Thr Leu Lys Asp Asn Thr Lys Arg Thr Phe Thr Val  
 450 455 460 465  
 Asp Val Lys Lys Asp Pro Val Leu Gln Asp Ile Lys Val Asp Ala Thr  
 50 470 475 480  
 Ser Val Lys Leu Ser Asp Glu Ala Val Gly Gly Glu Val Glu Gly  
 55 485 490 495  
 Val Asn Gln Lys Thr Ile Lys Val Ser Ala Val Asp Gln Tyr Gly Lys  
 500 505 510  
 Glu Ile Lys Phe Gly Thr Lys Gly Lys Val Thr Val Thr Asn Thr  
 60 515 520 525  
 Glu Gly Leu Val Ile Lys Asn Val Asn Ser Asp Asn Thr Ile Asp Phe  
 530 535 540 545

Asp Ser Gly Asn Ser Ala Thr Asp Gln Phe Val Val Val Ala Thr Lys  
 550 555 560  
 Asp Lys Ile Val Asn Gly Lys Val Glu Val Lys Tyr Phe Lys Asn Ala  
 565 570 575 5  
 Ser Asp Thr Thr Pro Thr Ser Thr Lys Thr Ile Thr Val Asn Val Val  
 580 585 590  
 Asn Val Lys Ala Asp Ala Thr Pro Val Gly Leu Asp Ile Val Ala Pro  
 595 600 605 10  
 Ser Lys Ile Asp Val Asn Ala Pro Asn Thr Ala Ser Thr Ala Asp Val  
 610 615 620 625 15  
 Asp Phe Ile Asn Phe Glu Ser Val Glu Ile Tyr Thr Leu Asp Ser Asn  
 630 635 640  
 Gly Arg Arg Gln Lys Lys Val Thr Pro Thr Ala Thr Thr Leu Val Gly  
 645 650 655 20  
 Thr Lys Lys Lys Lys Val Asn Gly Asn Val Leu Gln Phe Lys Gly  
 660 665 670  
 Asn Glu Glu Leu Thr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Thr Gly Asn Val Asp  
 675 680 685 25  
 Gly Thr Ala Glu Gly Met Thr Lys Arg Ile Pro Gly Lys Tyr Ile Asn  
 690 695 700 705  
 Ser Ala Ser Val Pro Ala Ser Ala Thr Val Ala Thr Ser Pro Val Thr  
 710 715 720 30  
 Val Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asn Asp Leu Thr Phe Glu Glu Leu Ile  
 725 730 735  
 Phe Gly Val Ile Asp Pro Thr Gln Leu Val Lys Asp Glu Asp Ile Asn  
 740 745 750 35  
 Glu Phe Ile Ala Val Ser Lys Ala Ala Lys Asn Asp Gly Tyr Leu Tyr  
 755 760 765 40  
 Asn Lys Pro Leu Val Thr Val Lys Asp Ala Ser Gly Lys Val Ile Pro  
 770 775 780 785  
 Thr Gly Ala Asn Val Tyr Gly Leu Asn His Asp Ala Thr Asn Gly Asn  
 790 795 800 45  
 Ile Trp Phe Asp Glu Glu Gln Ala Gly Leu Ala Lys Lys Phe Ser Asp  
 805 810 815  
 Val His Phe Asp Val Asp Phe Ser Leu Thr Asn Val Val Lys Thr Gly  
 820 825 830 50  
 Ser Gly Thr Val Ser Ser Ser Pro Ser Leu Ser Asp Ala Ile Gln Leu  
 835 840 845  
 Thr Asn Ser Gly Asp Ala Val Ser Phe Thr Leu Val Ile Lys Ser Ile  
 850 855 860 865 55  
 Tyr Val Lys Gly Ala Asp Lys Asp Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Pro  
 870 875 880 60  
 65

Val Ser Val Asn Val Thr Val Thr Lys  
885 890

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 498 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: beides  
 10 (D) TOPOLOGIE: linear

## 15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CCCATGGACC CGTCCAAGGA CTCCAAAGCT CAGGTTCTG CAGCCGAAGC TGGTATCACT 60  
 20 GGCACCTGGT ATAACCAACT GGGGTGCACT TTCATTGTGA CCGCTGGTGC GGACGGAGCT 120  
 CTGACTGGCA CCTACGAATC TGCAGTTGGT AACGCAGAAT CCCGCTACGT ACTGACTGGC 180  
 CGTTATGACT CTGCACCTGC CACCGATGGC TCTGGTACCG CTCTGGGCTG GACTGTGGCT 240  
 25 TGGAAAAACA ACTATCGTAA TGCGCACAGC GCCACTACGT GGTCTGGCCA ATACGTTGGC 300  
 GGTGCTGAGG CTCGTATCAA CACTCAGTGG CTGTTAACAT CCGGCACTAC CGAACCGAAT 360  
 GCATGGAAAT CGACACTAGT AGGTCTGAC ACCTTTACCA AAGTTAAGCC TTCTGCTGCT 420  
 30 AGCATTGATG CTGCCAAGAA AGCAGGCGTA AACAACGGTA ACCCTCTAGA CGCTGTTCA 480  
 CAATAATAAG GATCCGGG 498

## 35 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

40 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 29 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## 45 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

TTCATCGTAA ACGCCGAATT TTGTTCTG 29

## 50 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

55 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 26 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## 60 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AGGGAAATAT ATCAACTCTG CAAGTG 26

## 65 Patentansprüche

1. V erfahren zur Herstellung von S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man

(a) eine gram-negative prokaryontische Wirtszelle bereitstellt, die transformiert ist mit einer für ein S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure, ausgewählt aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis Position 3684 in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt;

(b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen und

- (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle gewinnt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man eine *E. coli*-Wirtszelle verwendet.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man das Polypeptid in Form einer assemblierten S-Layer-Struktur aus dem Inneren der Wirtszelle gewinnt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die für das S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure eine oder mehrere Insertionen enthält, die für Peptid- oder Polypeptidsequenzen kodieren.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen ausgewählt werden aus Nukleotidsequenzen, die für Cysteinreste, Bereiche mit mehreren geladenen Aminosäuren oder Tyr-Resten, DNA-bindende Epitope, metallbindende Epitope, immunogene Epitope, allergene Epitope, antigene Epitope, Streptavidin, Enzyme, Cytokine oder Antikörper-bindende Proteine kodieren.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Streptavidin kodieren.

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für immunogene Epitope aus Herpesviren, insbesondere Herpesvirus 6 oder FMDV, kodieren.

8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Enzyme, wie etwa Polyhydroxybuttersäuresynthase oder bakterielle Luciferase, kodieren.

9. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Cytokine, wie etwa Interleukine, Interferone oder Tumornekrosefaktoren, kodieren.

10. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für Antikörper-bindende Proteine, wie etwa Protein A oder Protein G, kodieren.

11. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für antigene Epitope kodieren, die an Cytokine oder Endotoxine binden.

12. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionen für metallbindende Epitope kodieren.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß 5'-seitig der für das S-Layer-Protein kodierenden Nukleinsäure in operativer Verknüpfung eine für ein grampositives Signalpeptid kodierende Nukleinsäure angeordnet ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die für das Signalpeptid kodierende Nukleinsäure

- (a) den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nukleotidsequenz,
- (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz oder/und
- (c) eine zu den Sequenzen aus (a) oder/und (b) mindestens 80% homologe Nukleotidsequenz umfaßt.

15. Nukleinsäure, die für ein rekombinantes S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus

- (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,
- (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und
- (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt,

wobei die Nukleinsäure innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält.

16. Nukleinsäure nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertionsstelle an Position 582, 878, 917, 2504 oder/und 2649 der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nukleotidsequenz lokalisiert ist.

17. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 enthält.

18. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 oder einem Vektor nach Anspruch 17 transformiert ist.

19. Zelle nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine gram-negative prokaryontische Zelle, insbesondere eine *E. coli*-Zelle ist.

20. Rekombinantes S-Layer-Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer Nukleinsäure nach Anspruch 15 oder 16 kodiert ist.

21. Rekombinante S-Layer-Struktur, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Untereinheit mindestens ein Protein nach Anspruch 20 enthält.

22. S-Layer-Struktur nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie weiterhin als Untereinheit mindestens ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein enthält.

23. S-Layer-Struktur nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie mehrere kovalent oder durch Affinitätsbindung miteinander verknüpfte Schichten umfaßt.

24. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 20 oder einer S-Layer-Struktur nach einem der Ansprüche 21 bis 23 als Vakzin oder Adjuvans.

25. Verwendung nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Vakzin oder Adjuvans weiterhin einen Bakterienghost umfaßt, der gegebenenfalls in seiner Membran weitere immunogene Epitope enthält.

5 26. Nukleinsäure, die für ein S-Layer-Protein kodiert und ausgewählt ist aus  
 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,  
 (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und  
 10 (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

27. Nukleinsäure nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß sie innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs mindestens eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält.

15 28. Vektor, dadurch gekennzeichnet, daß er mindestens eine Kopie einer Nukleinsäure nach Anspruch 26 oder 27 enthält.

29. Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit einer Nukleinsäure nach Anspruch 26 oder 27 oder einem Vektor nach Anspruch 28 transformiert ist.

30. S-Layer-Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer Nukleinsäure nach Anspruch 27 kodiert ist.

20 31. Rekombinante S-Layer-Struktur, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Untereinheit mindestens ein rekombinantes S-Layer-Protein enthält, das von einer Nukleinsäure nach Anspruch 27 kodiert ist.

32. Verwendung eines S-Layer-Proteins nach Anspruch 30 oder einer S-Layer-Struktur nach Anspruch 31 als Vakzin oder Adjuvans.

33. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten S-Layer-Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß man  
 25 (a) eine Wirtszelle bereitstellt, die eine für ein S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure enthält, die innerhalb des für das S-Layer-Protein kodierenden Bereichs eine Peptid- oder Polypeptid-kodierende Insertion enthält,  
 (b) die Wirtszelle unter solchen Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression der Nukleinsäure und zu einer Erzeugung des davon kodierten Polypeptids führen, und  
 (c) das resultierende Polypeptid aus der Wirtszelle oder dem Kulturmedium gewinnt.

34. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ausgewählt wird aus  
 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 3684 in SEQ ID NO. 1 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,  
 (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und  
 35 (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

35. Verfahren nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die für das rekombinante S-Layer-Protein kodierende Nukleinsäure ausgewählt wird aus  
 (i) einer Nukleinsäure, welche die von Position 1 bis 2763 in SEQ ID No. 5 gezeigte Nukleotidsequenz gegebenenfalls ohne den Signalpeptid-kodierenden Abschnitt umfaßt,  
 (ii) einer Nukleinsäure, welche eine der Nukleinsäure aus (i) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nukleotidsequenz umfaßt, und  
 (iii) einer Nukleinsäure, welche eine mit den Nukleinsäuren aus (i) oder/und (ii) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nukleotidsequenz umfaßt.

40 36. Verfahren nach einem der Ansprüche 33—35, dadurch gekennzeichnet, daß in der Wirtszelle ein weiteres S-Layer-Gen exprimiert wird, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert.

37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, daß das nichtmodifizierte S-Layer-Protein in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden.

45 38. Verfahren nach einem der Ansprüche 33—35, dadurch gekennzeichnet, daß in der Wirtszelle kein weiteres S-Layer-Gen exprimiert wird, das für ein nichtmodifiziertes S-Layer-Protein kodiert, welches in der Lage ist, eine mit dem rekombinanten S-Layer-Protein kompatible S-Layer-Struktur auszubilden.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 33—38, dadurch gekennzeichnet, daß man eine prokaryontische Wirtszelle verwendet.

50 40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß man eine gram-positive Wirtszelle verwendet.

55 41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, daß man *B.stearothermophilus* verwendet.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

60

65

**- Leerseite -**

2

Fig.1

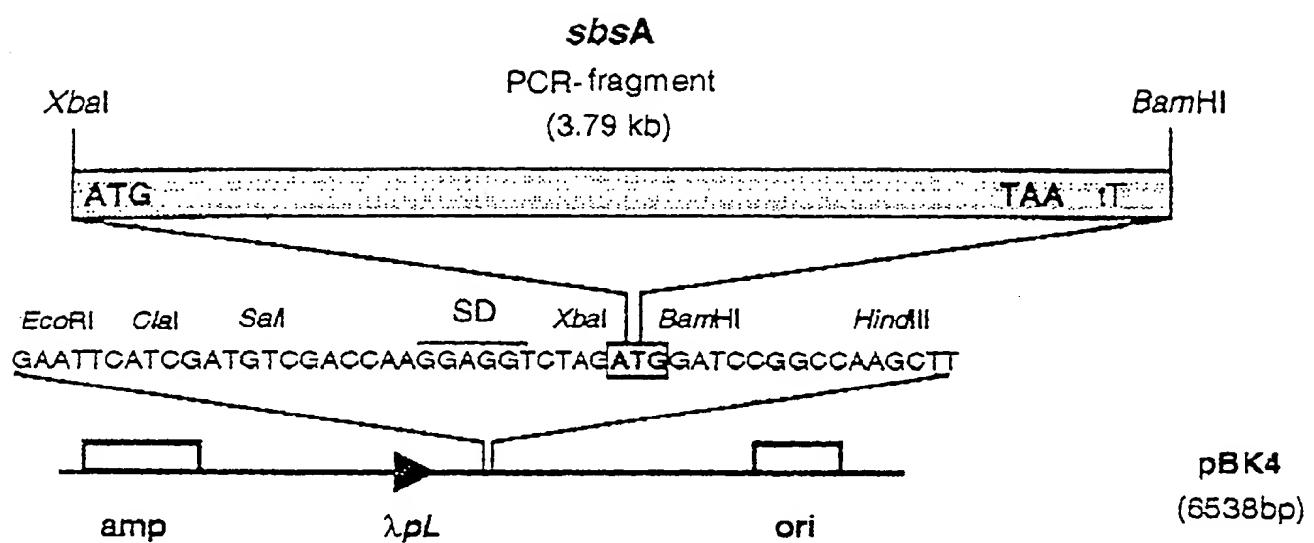
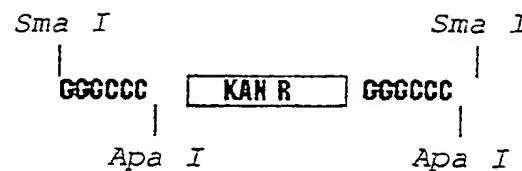


Fig. 2

A)



B)

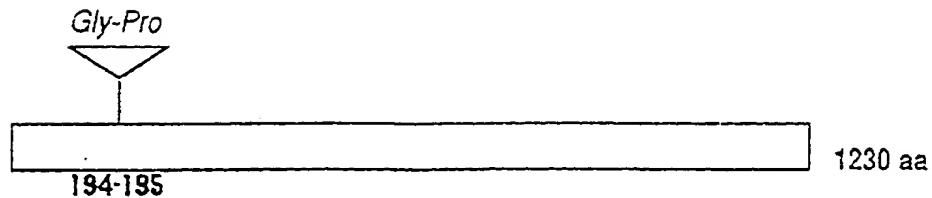


C)

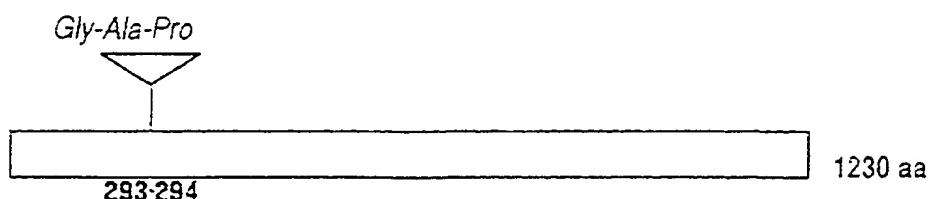


Fig. 3

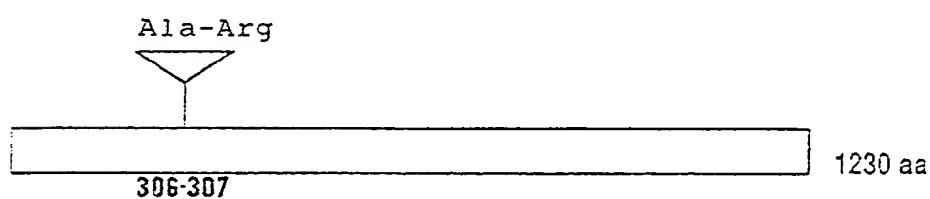
A)



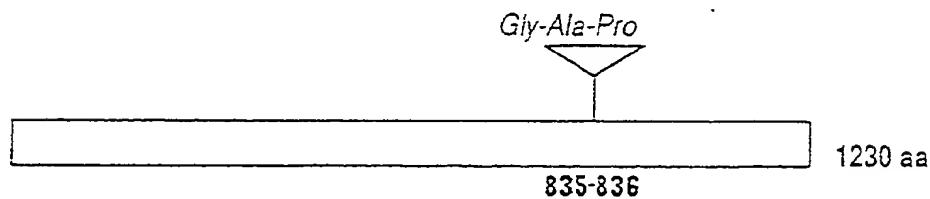
B)



C)



D)



E)

